

拟粉红锁掷孢酵母降解展青霉素的蛋白质组学

赵利娜, 孙艺文, 张晓云, 张红印*

(江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 展青霉素(PAT)又称棒曲霉素,是一种主要由曲霉属、青霉属等产生的有毒的真菌次级代谢产物,主要污染水果及其制品,具有细胞毒性、致畸性及遗传毒性等,严重威胁人类的健康。近年来,生物防治因其安全、绿色、高效等优点成为一种具有良好发展前景的控制水果真菌毒素产生的方法。有研究表明,部分酵母菌可以直接抑制PAT的产生,有的甚至可以降解PAT,但具体的降解机制尚不明确。作者所在实验室前期研究发现,拟粉红锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus* Y16)能够在体外降解PAT,但具体的降解机制尚未明确,作者利用蛋白质组学技术对*S. pararoseus* Y16降解PAT的机制进行了初步研究,可以为真菌毒素的生物降解提供新的理论依据。

关键词: 拟粉红锁掷孢酵母;展青霉素;蛋白质组;降解

中图分类号:TS 20 文章编号:1673-1689(2019)03-0010-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.002

Proteomic Study on the Degradation of Patulin by *Sporidiobolus pararoseus*

ZHAO Lina, SUN Yiwen, ZHANG Xiaoyun, ZHANG Hongyin*

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Patulin (PAT) is one of toxic fungal secondary metabolites, mainly produced by *Aspergillus sp* and *Penicillium sp*, it has been identified in various fruits and fruit products all over the world, and it has cytotoxicity, teratogenicity and genotoxicity, hence, it poses potential hazard to human and animals. In recent years, biological control has become a promising method to control the mycotoxin produced by fruits because of its advantages of safety, green and high efficiency. It has been reported that, some strains of yeast can directly inhibit the production of PAT, and even degrade PAT, however, the mechanism of controlling and degradation PAT underlying is not clear. Our previous study found that, *Sporidiobolus pararoseus* Y16 can significantly degrade PAT in vitro, but the possible mechanism is not clear, in this study, the mechanism of degradation of PAT by *S. pararoseus* using proteomic technology was investigated. This study can provide a new theoretical evidence for the biological degradation of mycotoxins.

Keywords: *Sporidiobolus pararoseus*, patulin, proteomics, degrade

收稿日期: 2017-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701971);江苏省“333 高层次人才培养工程”项目(1711360006);江苏省高校优势学科项目。

作者简介: 赵利娜(1986—),女,博士,讲师,硕士研究生导师,主要从事果蔬采后病害生物防治方面的研究。E-mail: linazhao@ujs.edu.cn

通信作者: 张红印(1972—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事果蔬采后病害生物防治方面的研究。E-mail: zhanghongyin126@126.com

引用本文: 赵利娜,孙艺文,张晓云,等. 拟粉红锁掷孢酵母降解展青霉素的蛋白质组学[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(03):10-16.

展青霉素(Patulin, PAT)又称棒曲霉素,是一种主要由曲霉属、青霉属等产生的有毒的真菌次级代谢产物,主要污染水果及其衍生制品。食用受展青霉素污染的食物和饮料严重威胁人类的健康^[1],其可以氧化损伤人类细胞导致致突变性^[2]、细胞毒性^[3]、致畸性^[4]以及遗传毒性^[5]等。食品生产中展青霉素的污染十分普遍,广泛存在于桔子、苹果、梨、菠萝、玉米以及谷物等产品中,特别是在苹果及其制品中展青霉素的污染最为严重。

PAT 是对人类危害最大的真菌毒素之一^[6],可以引起一些急慢性病症及细胞水平病症。动物试验表明,小鼠在注射 PAT 后会导致皮下组织水肿、呼吸困难、肺充血等急性症状。大剂量的 PAT 还具有致畸性、免疫毒性、致突变性及遗传毒性。其细胞毒性是由于 PAT 能改变细胞膜的通透性,导致 K^+ 过度流失,抑制大分子物质合成,最终导致细胞活性丧失。食品中污染 PAT 严重威胁着人类的健康,相关机构已严格限制其含量标准。欧盟规定果汁、果酒(仅以苹果和山楂为原料制成的产品)中 PAT 的最高限量为 50 $\mu\text{g/L}$, 固体苹果产品及其制品中 PAT 的最高限量为 25 $\mu\text{g/L}$, 而婴幼儿食品中 PAT 的最高限量为 10 $\mu\text{g/L}$ ^[7];美国食品药品监督管理局(FDA)规定苹果及其制品中 PAT 的含量不得高于 50 $\mu\text{g/kg}$ ^[8];苹果及其制品中 PAT 的限量标准在我国国标中是 50 $\mu\text{g/L}$ ^[9]。因此,控制食品中的 PAT,尤其是控制苹果及其制品中 PAT 的污染,具有十分重要的卫生学意义。

控制苹果中 PAT 污染的传统方法是使用化学合成杀菌剂。然而,随着化学杀菌剂的持续和大量使用,病原体逐渐产生了抗药性,不仅防治效力降低,而且化学残留也会对食物造成污染。因此,人们迫切需要寻求可替代化学杀菌剂的安全、高效、环保的新方法。近年来国内外的研究表明,部分酵母菌可以直接抑制 PAT 的产生,有的甚至可以降解 PAT。例如:胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)^[10-11]、卡利毕克毕赤酵母(*Pichia caribbica*)^[12]、红冬孢酵母(*Rhodospiridium kratochvilovae*)^[13]等拮抗菌均能不同程度地控制和降解 PAT。Castria 等^[14]的研究表明,初始质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 PAT 分别与胶红酵母(*R. glutinis*)和罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)共同培养 10 d 后,发现 PAT 的质量浓度分别降低了 82% 和 47%。Zhu 等^[15]的研究表明,*R.*

paludigenum 可以降低苹果体内 PAT 的含量,同时在体外实验中初始质量浓度为 10 mg/L 的 PAT 与酵母培养 3 d 后已完全检测不到。

作者所在课题组从江苏省镇江市江心洲有机果园筛选得到一株对苹果及葡萄具有高效生物防治效力的酵母菌^[16],经鉴定为拟粉红锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus* Y16)。初步试验发现该酵母菌不仅能够降低苹果由扩展青霉引起的青霉病的发病率,同时还能够降低苹果伤口处 PAT 的积累,并且在体外能够降解 PAT^[17],但具体的降解机制尚不明确。作者拟利用蛋白质组学技术对拟粉红锁掷孢酵母体外降解 PAT 的相关机制进行研究,不仅可以为拮抗菌降解 PAT 的研究提供一定的理论依据,也将有助于推动生物法控制及降解 PAT 的实际应用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

Ettan IPGhor 等电聚焦仪、SDS-PAGE 电泳仪、Image Scanner 扫描仪:美国 GE Healthcare 公司;UltrafleXtrem MALDI-TOF/TOF 质谱仪:美国 Bruker Daltonics 公司;TS-A 型脱色摇床:金坛市中大仪器厂;PHS-3BW 酸度计:上海理达仪器厂;UV-6100A 型紫外可见分光光度计:上海元析仪器有限公司;GR85DR 型全自动高压灭菌锅:致微(厦门)仪器有限公司;恒温摇床:太仓市强乐试验设备厂产品;电子显微镜:江南光学仪器厂产品;高速冷冻离心机:湘仪离心机仪器有限公司产品;血球计数板:购自丹阳市健陵医疗器械公司。

1.2 酵母菌

酵母菌 *S. pararoseus* Y16: 作者所在课题组分离鉴定并保存的菌种,于 NYDA 培养基(酵母浸膏 5 g,牛肉膏 8 g,葡萄糖 10 g,琼脂 20 g,无菌水定容至 1 L 后灭菌)中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,经 NYDB 培养基(酵母浸膏 5 g,牛肉膏 8 g,葡萄糖 10 g,无菌水定容至 1 L)活化(28 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 摇床培养 20 h)后,7 500 r/min 离心 10 min,无菌水洗涤两次,用无菌水重新悬浮酵母细胞,血球计数法计数并用无菌水调至所需浓度。

1.3 总蛋白质的提取

经活化后的 *S. pararoseus* Y16 用无菌水调整其浓度为 1×10^8 个/ mL ,在 20 mL NYDB 培养基中加入

1 mL *S. pararoseus* Y16 菌悬液,分两组处理:一组添加终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PAT 储备液,另一组添加无菌水作为对照,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 18 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min,并用预冷的无菌水洗涤两次。将菌体加入液氮快速研磨,把菌体粉末倒入 50 mL 离心管中,加入 10 mL TE 缓冲液(50 mmol/L),再加入 174 μL 质量浓度为 10 mg/mL 的 PMSF 溶液。加入终质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 RNase A 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNase,充分振荡,置于冰上静置 30 min。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min,取全部上清液,加入 2 倍体积 20% TCA/丙酮溶液(预冷),充分振荡混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜(12~16 h)。上下颠倒混匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,之后用预冷的丙酮洗涤沉淀 2 次。沉淀移至 1.5 mL EP 管,再加入 1 mL 丙酮清洗沉淀两次,弃上清液,13 000 r/min 离心 2 min,置于冰上风干。加入 200 μL 裂解液溶解蛋白质,并用移液枪不断吹打促溶(冰上)。若蛋白质含量较高,可增加裂解液用量,或相应延长裂解时间。用 Barford 法^[18]测定蛋白质浓度后,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 双向电泳

IPG 胶条的水化上样:将-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存的 IPG (24 cm,pH 3~10)胶条取出,室温放置 30 min。将水化缓冲液置于室温融化,加入 2.8 mg DTT 和 5 μL IPG 缓冲液(pH 3~10),充分混匀。蛋白质上样量为 3 mg,与适量水化液吹打混匀,总体积为 450 μL 。把泡涨盘放入 IPG box,样品均匀点到盘中。去掉胶条保护膜,缓缓放到胶条槽中,胶面正对蛋白质样品(避免气泡),保持 IPG box 水平,室温水化 12~16 h。

第一向等电聚焦(IEF):水化结束后,将 IPG box 中的 IPG 胶条转移至聚焦盘中,胶面朝上,使胶条上的正极对应于聚焦盘上的正极。在胶条两端加盖滤纸片,滤纸片的三分之一压住胶条。将电极丝卡住滤纸片,在胶条上覆盖石蜡油之后,合上盖子。设置 IPGphor 等电聚焦程序。每根胶条的最大电流 50 μA ,聚焦温度 20 $^{\circ}\text{C}$ 。等电聚焦参数设置为:① 100 V,快速 1 h;② 200 V,快速 2 h;③ 500 V,快速 1 h;④ 100 V,慢速 2 h;⑤ 10 000 V,慢速 3 h;⑥ 10 000 V,快速 6.5 h;⑦ 500 V,快速 15 h。

第二向 SDS-PAGE 电泳:配制 12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。按照 GE 说明书组装灌胶模具,灌胶后每块胶加入 1 mL 饱和正丁醇封胶。凝胶凝固后将

聚焦结束后的胶条取出,滤纸吸去多余的矿物油。置于泡涨盘中进行平衡,每两根胶条加入 10 mL 平衡缓冲液 I(含 0.1 g DTT),将泡涨盘置于水平摇床上,平衡 15 min。结束后倒掉多余的平衡液,再等体积加入 10 mL 平衡缓冲液 II(含 0.25 g IAM),步骤同第一次平衡。将 IPG 胶条取出,浸泡于 1 $\times$ 电泳缓冲液中。待 SDS-PAGE 凝胶完全凝固后,将凝胶固定于电泳架上。将低熔点琼脂糖用移液器加入到凝胶上部,将胶条置于凝胶上表面,使其充分贴合,同时避免结合处产生气泡。转入电泳槽进行第二向蛋白质电泳。打开电泳仪,循环水温度 17 $^{\circ}\text{C}$,电泳程序 1 W/胶条,运行约 60 min,待蓝色条带进入凝胶后,电压增加到 15 W/胶条,待蓝色条带距离底部 1 cm 时关闭电泳设备。将凝胶小心转移到染色托盘中。加入适量的染色液置于染色盒中,在水平摇床上室温染色 2~3 h。染色结束后,用双蒸水冲洗凝胶,加入脱色液,脱色直至蛋白质点清晰为止。将凝胶扫描分析或 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存于 7%冰醋酸溶液。

1.5 凝胶图谱分析及质谱实验操作流程

凝胶使用 ImageScannerIII 扫描仪进行扫描,分辨率 600 dpi。使用 ImageMaster 7.0 软件对凝胶上的蛋白点进行分析。根据分析结果将蛋白质点从凝胶上切下,用蒸馏水洗两次。用 NH_4HCO_3 /乙腈(100 mmol/L)脱色,清晰至透明,去除上清液。用乙腈(100%)脱水 2 次,每次 5 min,得到白色胶粒。加入 5 μL 胰酶(10 ng/ μL)置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 中 30~60 min,加入 20 μL NH_4HCO_3 (25 mmol/L)缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应过夜。上清液经真空冷冻干燥后,用于蛋白质 MS 分析。样品使用 UltrafleXtrem MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行检测。

1.6 蛋白质鉴定

肽指纹图谱信息通过 FlexAnalysis 软件和 BioTools 软件进行分析。质谱结果利用 Mascot 本地数据库进行搜索,搜索参数为:NCBI 真菌数据库,酶类是胰蛋白酶,Peptide tol 为 ± 0.3 ,半胱氨酸的氨酰甲基化及甲硫氨酸的氧化修饰。鉴定结果利用 MASCOT 的 Mowse score。

2 结果与分析

2.1 拟粉红锁掷孢酵母蛋白质双向电泳图

S. pararoseus Y16 在未添加 PAT 和添加 PAT 的 NYDB 培养基中分别培养 18 h 后,收集酵母细

胞提取蛋白质进行 SDS-PAGE 凝胶双向电泳,见图 1。通过 ImageMaster 7.0 分析后,结果表明,添加 PAT 和未添加 PAT 的 NYDB 培养基中 *S. pararoseus* Y16 共检测出 236 个蛋白质点,97 种蛋白质表达量有显著性差异,其中 68 个上调蛋白质,29 个下调蛋白质,集中对 30 种高峰度差异蛋白质进行鉴定。MS/MS 质谱分析的数据提交 Mascot。30 个蛋白质点中有 5 个没有与数据库中相匹配的信息,鉴定需要进一步确定。

2.2 PAT 诱导 *S. pararoseus* Y16 蛋白质差异质谱鉴定结果

表 1 简述了 30 个差异蛋白质点的相对分子质量、等电点等基本情况。大多数差异表达的蛋白质与基础代谢有关,还包括一些环境胁迫下产生的应激蛋白,以及多种假设蛋白(点 7,13,17,20,25,26)。结果表明 PAT 可以激活 *S. pararoseus* Y16 的基础代谢,引起细胞的免疫调节,由于差异表达的蛋白质参与了多种代谢途径,所以 *S. pararoseus* Y16 对 PAT 的反应机制是复杂的。

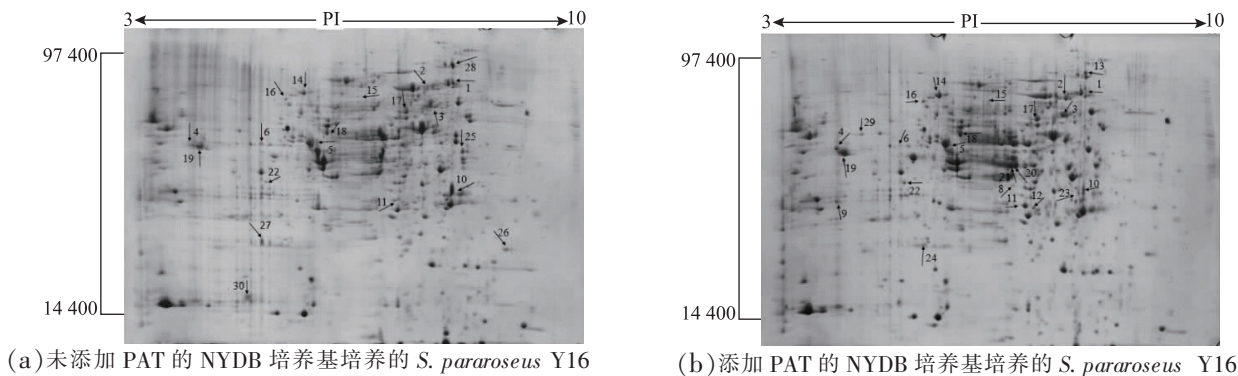


图 1 未添加 PAT 和添加 PAT 的 NYDB 培养基培养的 *S. pararoseus* Y16 蛋白质双向电泳图

Fig. 1 Two-dimensional pattern of intracellular proteins of *S. pararoseus* Y16 after cultivation in NYDB or NYDB amended with PAT

表 1 未添加 PAT 和添加 PAT 的 NYDB 培养基培养的 *S. pararoseus* Y16 差异蛋白质谱肽段在 Mascot 中的分析结果

Table 1 Identification of cellular proteins of *S. pararoseus* Y16 showing differential expression after cultivation in NYDB or NYDB amended with PAT using MS/MS analysis

蛋白质点编号	蛋白质名称	登录号	相对分子质量	来源	等电点	得分
1	70 000 热激蛋白 1/8	gil472585418	69 760	<i>Rhodospiridium toruloides</i> NP11	5.03	246
2	热激蛋白 sks2	gil634354649	69 433	<i>Microbotryum violaceum</i> p1A1 Lamole	5.43	153
3	伴侣蛋白 Cpn60	gil407922985	61 717	<i>Macrophomina phaseolina</i> MS6	5.43	98
5	异柠檬酸脱氢酶[NAD] subunit 2	gil634353579	39 790	<i>Microbotryum violaceum</i> p1A1 Lamole	6.97	222
6	60S 核糖体蛋白 L4-A	gil634351247	40 437	<i>Microbotryum violaceum</i> p1A1 Lamole	7.41	131

2.3 差异蛋白质的 GO 分析

质谱结果在 Mascot 数据库比对得到蛋白质的基因 ID,通过 Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org>)找到蛋白质相应的 GO ID。根据差异蛋白质的 GO ID 使用 Notepad++ 软件对蛋白质 GO 信息进行分类。蛋白质的 GO 信息分为生物过程(Biological process)、分子功能(Molecular function)、细胞组分(Cellular component)三大功能。对未添加 PAT 和添加 PAT 培养导致的 *S. pararoseus* Y16 细胞差异蛋白质进行 GO 富集分析,见图 2。由图 2 可知,差异蛋白质主要涉及生物过程和细胞组分,少数与分子功能相关。涉及到主要的 10 种生物过程中参与最多的是细胞过程和代谢过程,其次是应激反应、生物体调节过程、生物附着、色素沉积等;差异蛋白质参与的细胞组成主要包括:细胞组分合成、大分子配合物合成、细胞器组成及膜封闭腔的形成等;在分子功能中,差异蛋白质主要参与结合作用、催化作用、电子载体和结构分子。

续表 1

蛋白质 点编号	蛋白质名称	登录号	相对分 子质量	来源	等电点	得分
7	假设蛋白	gil759976544	25672	<i>Nocardia thailandica</i>	6.17	67
8	70 000 热激蛋白 1/8	gil472582959	68773	<i>Rhodospiridium toruloides</i> NP11	5.33	106
9	60S 核糖体蛋白 I2	gil472580742	27238	<i>Rhodospiridium toruloides</i> NP11	8.35	99
11	甘露糖-1-磷酸鸟嘌呤转移酶	gil472585694	48412	<i>Rhodospiridium toruloides</i> NP11	5.22	77
13	假设蛋白 MVLG_02042	gil634352656	88008	<i>Microbotryum violaceum</i> p1A1 Lamole	5.11	104
14	富马酸还原酶(NADH)	gil58259717	68852	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. neoformans JEC21	6.31	96
15	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白 subunit	gil347134	73670	<i>Physcomitrella patens</i>	7.06	65
16	异柠檬酸裂解酶	gil634352712	59471	<i>Microbotryum violaceum</i> p1A1 Lamole	6.93	92
17	假设蛋白 MGL_1288	gil164661795	56314	<i>Malassezia globosa</i> CBS 7966	6.19	62
18	柠檬酸合酶	gil634352057	51783	<i>Microbotryum violaceum</i> p1A1 Lamole	7.76	73
19	天冬氨酸转氨酶	gil342321008	110645	<i>Rhodotorula glutinis</i> ATCC 204091	8.5	116
20	假设蛋白 EC90111_5491	gil386211066	4373	<i>Escherichia coli</i> 9.0111	5.5	64
21	果糖二磷酸醛缩酶 1	gil628301025	39835	<i>Cladophialophora yegresii</i> CBS 114405	5.8	107
22	2,5-二酮-D-葡萄糖酸还原酶	gil497459912	30632	<i>Marine actinobacterium</i> PHSC20C1	4.71	74
23	β -酮酰基合成酶	gil407002476	131295	uncultured bacterium	6.97	75
25	假设蛋白 PISMIDRAFT_26341	gil750973740	35739	<i>Pisolithus microcarpus</i> 441	5.13	99
26	假设蛋白	gil727760396	62558	<i>Pseudomonas</i> sp. URHB0015	5.92	64
27	40 S 核糖体蛋白 s7-a	gil385302105	21615	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> AWRI1499	7.86	113
28	热激蛋白	gil50421253	78523	<i>Komagataella pastoris</i>	5.15	82
30	尿苷二羧酸葡萄糖 4-异构酶	gil411455763	33268	<i>Desulfotomaculum hydrothermale</i> Lam5 = DSM 18033	8.29	64

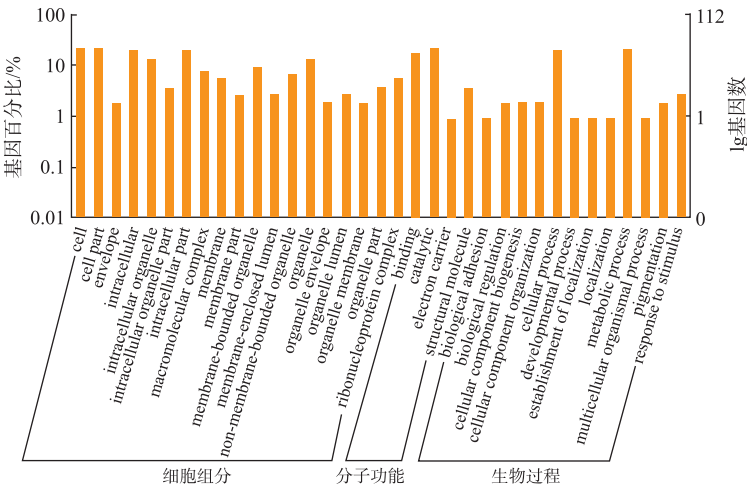


图 2 未添加 PAT 和添加 PAT 对 *S. pararoseus* Y16 细胞差异蛋白质 GO 分析

Fig. 2 GO categorization of *S. pararoseus* Y16 showing differential expression after cultivation in NYDB or NYDB amended with PAT

3 结 语

蛋白质图谱经过 IPM7.0 软件分析，添加 PAT 和未添加 PAT 条件下的 *S. pararoseus* Y16 细胞大

约检测出总蛋白质 236 个，97 种蛋白质表达量有显著性差异，其中 68 个上调蛋白质，29 个下调蛋白质，对其中 30 种高峰度差异蛋白质进行了鉴定。差异蛋白质涉及少数抗性相关蛋白质及多种基础代

谢相关的酶,包括氨基酸、糖类及能量代谢,说明 *S. pararoseus* Y16 在降解 PAT 的过程中,能增强一些与自身基础代谢及环境胁迫相关的酶,而这些酶可能与降解 PAT 的机制有关。对差异蛋白质进行 GO 分析可知,差异蛋白质的功能主要包括:细胞基础代谢、细胞结构、胞内途径、应激反应等。

研究表明,当细胞受到很大环境压力时,它的第一反应就是合成更多的热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP)。HSP 是一种重要的非特异性细胞保护蛋白质,可以保护基本生理过程中不可或缺的蛋白质,还能分解受损蛋白质,回收合成蛋白质的原材料,维持免疫细胞生存和内环境的稳定,将细胞内正常的生理生化过程维持在稳定状态^[19-20]。当病原菌等抗原激活免疫细胞产生免疫应答时,免疫细胞分泌的细胞因子可诱导生成热休克蛋白,其可协同免疫细胞完成一系列的应答过程^[21]。图 1 显示, PAT 可以刺激 *S. pararoseus* Y16 细胞中 Heat shock 70 000 protein (HSP70)(点 8)和 Heat shock protein sks2(点 2)表达上调,从而增强细胞对环境的适应能力,启动免疫应答,维持细胞的正常生命活动,由此推测 HSP 是 *S. pararoseus* Y16 降解 PAT 过程中重要的参与酶之一。

果糖二磷酸醛缩酶 (Fructose-bisphosphate aldolase, FBA)(点 21)是植物中参与糖酵解、糖异生和卡尔文循环的关键酶。Cai 等^[22]的研究表明, FBA 基因在生物和非生物的胁迫反应中具有重要的作用,并调节植物的生长和发育,而番茄 FBA 家族的扩增结果也表明, FBA 基因参与了对低温和高温胁迫的响应,并能增强种子萌发中的耐受性。甘露糖-1-磷酸鸟嘌呤转移酶 (mannose-1-phosphate guanylyltransferase, GDP)(点 11)属于转移酶家族,参与果糖和甘露糖的代谢。研究表明, GDP 可以参与合成甘露糖基甘油酸 (Mannosylglycerate, MG),对微生物的渗透压适应和高温稳定性起着重要作用^[23]。由图 1 可以看出, *S. pararoseus* Y16 在降解 PAT 的过程中, FBA 和 GDP 均显著上调。由此推测

S. pararoseus Y16 面对 PAT 造成的环境胁迫时, FBA 及 GDP 可能促进了酵母细胞的糖类代谢,并且增强了 *S. pararoseus* Y16 对环境的适应能力,为 PAT 的生物降解提供了条件。

除抗性相关蛋白质之外,多种与基础代谢相关的酶在 *S. pararoseus* Y16 降解 PAT 的过程中表达量也显著上调。包括 1)氨基酸代谢:天冬氨酸转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST)(点 19)催化芳香族氨基酸的合成,以天冬氨酸和酮酸为底物,具有高催化活性。2)脂肪酸代谢: β -酮酰基合成酶 (beta-ketoacyl synthase)(点 23)是催化丙二酰-ACP (malonyl-ACP)与脂肪酸链缩合的酶,是许多酶系统的组成部分,包括脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, FAS)以及 6-甲基水杨酸合成酶 (6-methylsalicylic acid synthase, MSAS),可以催化乙酰辅酶 A (acetyl-CoA),丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA)和 NADPH 形成长链脂肪酸,而脂肪酸是机体的主要能量来源之一。3)TCA 循环:柠檬酸合成酶 (citrate synthase, CS)(点 18)是调控酶,催化 TCA 循环中的第一步反应;产生于糖酵解及细胞呼吸作用中的柠檬酸循环;琥珀酸脱氢酶黄素蛋白 (succinate dehydrogenase flavoprotein, SDH)(点 15),属于细胞色素氧化酶,在 TCA 循环中为真核细胞线粒体和多种原核细胞需氧和产能的呼吸链提供电子。

此外,还有多种与代谢相关的蛋白质在 *S. pararoseus* Y16 与 PAT 共培养的过程中被诱导或抑制,包括伴侣蛋白 (Chaperonin Cpn60)(点 3), 2,5-二酮-葡萄糖酸还原酶 (2,5-diketo-D-gluconic acid reductase)(点 22),异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase)(点 5),异柠檬酸(裂合)酶 (isocitrate lyase, ICL)(点 16)及假设的 UDP-葡萄糖异构酶 (putative UDP-glucose 4-epimerase)(点 30)。

由于研究的局限性,对于鉴定出来的蛋白质,只能知道其在代谢过程中的基本功能,而无法验证其在降解 PAT 过程中的具体作用,这也是在后续研究中尚需努力的方面。

参考文献:

- [1] MARIN S, RAMOS A J, CANO-SANCHO G, et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment[J]. *Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2013, 60(10):218-237.
- [2] SCHUMACHER D M, METZLER M, LEHMANN L. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79

- cells, and its modulation by intracellular glutathione[J]. **Archives of Toxicology**, 2005, 79(2): 110-21.
- [3] WU T S, LIAO Y C, YU F Y, et al. Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60)[J]. **Toxicology Letters**, 2008, 183(3): 105-111.
- [4] DONMEZALTUNTAS H, GOKALPYILDIZ P, BITGEN N, et al. Evaluation of genotoxicity, cytotoxicity and cytostasis in human lymphocytes exposed to patulin by using the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) assay[J]. **Mycotoxin Research**, 2013, 29(2): 63.
- [5] 周思敏. 棒曲霉毒素对 HepG2 细胞的遗传毒性及氧化应激机制的研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2009.
- [6] WRIGHT S A I, FELICE D V D, IANIRI G, et al. Two rapid assays for screening of patulin biodegradation[J]. **International Journal of Environmental Science & Technology**, 2014, 11(5): 1387-1398.
- [7] PUEL O, GALTIER P, OSWALD I P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin[J]. **Toxins**, 2010, 2(4): 613.
- [8] EGMOND H P V, JONKER M A. Chapter 3-regulations and limits for mycotoxins in fruits and vegetables[J]. **Mycotoxins in Fruits & Vegetables**, 2008: 45-74.
- [9] ZHANG H. Analysis of 《the limited of mycotoxins in food》 new standard[J]. **Food Safety Guide**, 2013(1): 46-47.
- [10] 杨其亚. 植酸增强胶红酵母对草莓、苹果及桃果采后病害的控制效应[D]. 镇江: 江苏大学, 2011.
- [11] YANG Q, ZHANG H, ZHANG X, et al. Phytic acid enhances biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apples[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2015, 6(8): 1296.
- [12] CAO J, ZHANG H, YANG Q, et al. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2013, 162(2): 167.
- [13] CASTORIA R, MANNINA L, DURÁN PATRÓN R, et al. Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* strain LS11 [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2011, 59(21): 11571-11578.
- [14] CASTORIA R, MORENA V, CAPUTO L, et al. Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples[J]. **Phytopathology**, 2005, 95(11): 1271-1278.
- [15] ZHU R, YU T, GUO S, et al. Effect of the yeast *Rhodospiridium paludigenum* on postharvest decay and patulin accumulation in apples and pears[J]. **Journal of Food Protection**, 2015, 78(1): 157-163.
- [16] LI Q, LI C, LI P, et al. The biocontrol effect of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 against postharvest diseases in table grapes caused by *Aspergillus niger*, and the possible mechanisms involved[J]. **Biological Control**, 2017, 113: 18-25.
- [17] AKUTSU J I, ZHANG Z, MORITA R, et al. Identification and characterization of a thermostable bifunctional enzyme with phosphomannose isomerase and sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii* OT3[J]. **Extremophiles Life Under Extreme Conditions**, 2015, 19(6): 1077-1085.
- [18] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(s1-2): 248-254.
- [19] CHOI W I, JEON B N, YUN C O, et al. Proto-oncogene FBI-1 represses transcription of p21CIP1 by inhibition of transcription activation by p53 and Sp1[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2009, 284(19): 12633-12644.
- [20] XU Danning, TIAN Yunbo, HUANG Yumao, et al. Advances in protective effect of HSP70/HSP27 on immune cells[J]. **Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering**, 2011, 24(1): 56-60. (in Chinese)
- [21] NEUER A, MELE C, LIU H C, et al. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro[J]. **Human Reproduction**, 1998, 13(4): 987-990.
- [22] CAI B, LI Q, XU Y, et al. Genome-wide analysis of the fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA) gene family and functional characterization of FBA7 in tomato[J]. **Plant Physiology & Biochemistry**, 2016, 108: 251-265.